

① RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication :

2 766 712

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

⑫ N° d'enregistrement national :

97 10108

⑬ Int Cl⁶ : A 61 K 38/05 // (A 61 K 38/05, 33:30, 33:04, 31:375,
31:335, 31:195)

⑭

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑮ Date de dépôt : 01.08.97.

⑯ Priorité :

⑰ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 05.02.99 Bulletin 99/05.

⑱ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑲ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑴ Demandeur(s) : LABORATOIRE AGUETTANT
SOCIÉTÉ ANONYME — FR.

⑵ Inventeur(s) : BOTELLA ALAIN.

⑶ Titulaire(s) :

⑷ Mandataire(s) : BEAU DE LOMENIE.

⑸ COMPOSITION DE PREFERENCE SOLUTION ANTIOXYDANTE ET MEDICAMENTS EN FAISANT
APPLICATION.

⑹ L'invention concerne la pharmacothérapie des pathologies liées aux troubles du métabolisme oxydatif de production/ élimination de radicaux libres dans les organismes humains et animaux (stress oxydant).

L'un des objectifs essentiels de l'invention est la mise au point d'une composition utile, en particulier, comme médicament pour le traitement des susdites pathologies oxydatives. Un autre objectif assigné à ce médicament est d'être stable, peu toxique, simple à préparer et économique.

Ces objectifs sont atteints par l'invention qui concerne une composition anti-oxydante thérapeutique se présentant sous forme de solution aqueuse ou de lyophilisat et comprenant du glutathion réduit, de la N-acétylcystéine, du sélénium et du zinc, voire de la vitamine E et/ ou C.

Application: traitement de pathologies oxydatives, telles que le choc septique, le syndrome de détresse respiratoire aiguë, les polytraumatismes, l'ischémie/ reperfusion, les maladies auto-immunes, les brûlures étendues, les maladies inflammatoires digestives, et les pancréatites aiguës.

FR 2 766 712 - A1



Le domaine de la présente invention est celui du traitement thérapeutique et plus particulièrement pharmaceutique des pathologies ou des dysfonctionnements liés au trouble du métabolisme oxydatif, dans les organismes humains ou animaux.

5 En d'autres termes, on s'intéresse dans le cadre du présent exposé à la pharmacothérapie des maladies dans lesquelles intervient un stress oxydant, lequel est au moins en partie lié à un déséquilibre des mécanismes biochimiques de production et de régulation des radicaux libres et en particulier des radicaux libres oxygénés (RLO).

La présente invention concerne une composition anti-oxydante *per se*. Cette composition peut se présenter sous forme solide ou liquide, de préférence sous
10 forme de solution ou suspension voire émulsion. L'invention vise également l'utilisation d'une telle composition en tant que médicament et/ou pour la préparation de médicaments actifs dans le traitement des pathologies oxydatives.

A titre d'exemples de telles pathologies, on peut citer :

- 15 - choc septique, septicémie, syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA),
- syndrome respiratoire inflammatoire systémique (SRIS) pouvant conduire au syndrome de multidéfaillance viscérale (Multi-Organ-Failure : MOF).
- 20 - polytraumatismes,
- ischémie/reperfusion,
- brûlures étendues,
- maladies inflammatoires digestives
- pancréatite aigüe,
- 25 - maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de parkinson, les cancers, le sida.

La vie en aérobiose résulte de la capacité de certains organismes à utiliser de l'oxygène moléculaire au sein de leur métabolisme biochimique. Cet oxygène moléculaire alors essentiel aux processus cellulaires respiratoires et énergétiques, est
30 paradoxalement impliqué dans la production d'espèces chimiques hautement réactives, et potentiellement délétères pour l'organisme.

De nombreuses études expérimentales ont en effet montré que la vie en aérobiose s'accompagne d'une production continue de radicaux libres, principalement dérivés de l'oxygène. La production de ces molécules exerce dans l'organisme un effet
35 bénéfique lorsqu'il s'agit de détruire et d'éliminer des particules bactériennes, virales, parasitaires ou des cellules indésirables. Ces dérivés radicalaires synthétisés par les

cellules immunes activées (polynucléaires et monocytes/macrophages) participent ainsi à la première ligne de défense de l'organisme.

5 Cependant, en excès, ces molécules présentent un danger pour l'intégrité cellulaire et à plus grande échelle pour l'organisme. Le maintien de la vie cellulaire est en fait un équilibre entre la production inéluctable de radicaux libres et leur neutralisation par des systèmes endogènes de protection. Par conséquent, lorsque la production de radicaux libres augmente et/ou lorsque les défenses antioxydantes endogènes diminuent, il survient de façon systématique au sein de l'organisme des lésions plus ou moins graves. Ces molécules hautement réactives que sont les radicaux libres induisent des désordres structuraux au niveau des protéines, des acides nucléiques, des phospholipides et des polysaccharides. Dans ces conditions, certaines lésions irréversibles évoluent, inéluctablement vers une mort cellulaire par nécrose ou apoptose. Les diverses lésions occasionnées donneront ainsi naissance à une pathologie associée à une surcharge oxydative communément appelée "stress oxydant".

15 De nombreuses situations peuvent entraîner l'apparition d'un tel stress, notamment l'emballement des systèmes phagocytaires dans un contexte inflammatoire, associé à une septicémie pouvant évoluer vers un état de choc. L'implication des radicaux libres dans les processus délétères liés à la septicémie et au choc septique est clairement établie. En dépit d'un arsenal antibiotique de plus en plus extensif, extension compensée par l'émergence de germes multirésistants, la septicémie et son paroxysme : le choc septique, demeurent deux grands problèmes actuels de santé publique.

20 On rencontre également ce stress oxydant dans les SDRA, les SRIS, les polytraumatismes, les ischémies/reperfusions ou les maladies auto-immunes.

Ce protagoniste essentiel du stress oxydant qu'est le radical libre, se définit comme un atome possédant sur son orbitale externe un électron non couplé dit célibataire. Cet électron célibataire confère au radical libre une certaine instabilité. Un radical libre est donc une espèce chimique, neutre ou chargée, très réactive, à durée de vie très courte, qui cherche à prélever dans son environnement immédiat un électron de façon à reconstituer un doublet stable. La molécule aux dépens de laquelle l'opération s'effectue devient à son tour un radical libre, et ceci est le point de départ d'une réaction en chaîne.

35 En biologie, il s'agit le plus souvent de formes dites activées de l'oxygène, radicaux libres oxygénés (RLO) qui apparaissent essentiellement par gain unitaire d'électron, ou plus rarement par gain d'énergie.

Le premier radical formé au contact de l'oxygène est l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$. Ses voies de production sont essentiellement :

- une réduction monovalente de O_2 dans les mitochondries,
 - la voie de la xanthine oxydase (formation d'acide urique aux dépens de l'hypoxanthine). Cette voie est particulièrement importante dans l'endothélium des vaisseaux.
- (Ces deux premières voies sont stimulées au cours des lésions de reperfusion),
- l'oxydation des catécholamines,
 - la stimulation de la NADPH oxydase des neutrophiles.

On peut ajouter que des RLO se forment au cours des réactions catalysées par la prostaglandine synthétase et la lipoxigénase.

Dans les mitochondries, par une réaction de dismutation. ($2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$), l'anion superoxyde est transformé en peroxyde d'hydrogène, molécule fortement oxydante. Le peroxyde d'hydrogène en présence de Fe^{2+} (ou d'un autre métal de transition) est transformé par la réaction de Fenton en radical hydroxyle HO^{\bullet} , radical de loin le plus toxique ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + OH^{\bullet} + Fe^{3+}$). Le Fe^{2+} peut être régénéré en présence de $O_2^{\bullet-}$ à partir de Fe^{3+} ($Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$), ces deux dernières réactions constituant le cycle Haber-Weiss.

Le radical HO^{\bullet} est susceptible de dégrader les macromolécules comme les phospholipides membranaires formant alors des radicaux lipidiques qui sont à leur tour extrêmement réactifs, d'où propagation de la réaction radicalaire et destruction possible des membranes cellulaires. Le radical HO^{\bullet} attaque aussi l'ADN, les protéines, les protéoglycanes etc.

Le NO^{\bullet} (oxyde d'azote) est un radical libre synthétisé par les cellules endothéliales, les neurones et les macrophages. Au niveau des neurones, NO^{\bullet} assure un rôle de neurotransmetteur et de messenger intracellulaire. Le NO^{\bullet} formé dans les cellules endothéliales a une action vasorelaxante et il régule la pression sanguine. Dans les macrophages, il a un rôle de défense contre des agents infectieux à multiplication cellulaire.

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les autres hydroperoxydes ne sont pas des espèces de radicaux libres vrais, mais ils constituent une classe importante de métabolites oxygénés réactifs potentiellement toxiques.

Les radicaux libres peuvent attaquer n'importe quel composant biochimique de la cellule, mais les lipides, les protéines et les acides nucléiques sont des cibles particulièrement importantes. Les constituants lipidiques des membranes

des organelles et des cellules sont les premières structures rencontrées par ces espèces hautement réactives. Il s'ensuit qu'ils sont fréquemment endommagés par ces oxydants toxiques au cours d'un phénomène dénommé peroxydation lipidique. Le résultat de cette peroxydation n'est pas seulement une altération, voire une lyse des
5 cellules mais également la génération de produits réactionnels, qui sont eux-aussi des oxydants toxiques capables de causer d'autres préjudices.

Les radicaux libres jouent un rôle bénéfique dans la lutte contre les infections et contribuent activement à la destruction des bactéries et des parasites intracellulaires. Les radicaux libres participent à la réaction inflammatoire et
10 l'amplifient. En augmentant la perméabilité vasculaire, ils favorisent l'afflux de nouvelles cellules inflammatoires, jouant ainsi un rôle important dans les pathologies inflammatoires. La stimulation des neutrophiles s'accompagne d'une accélération de leur consommation d'oxygène ("choc respiratoire") avec activation d'une enzyme membranaire, la NADPH-oxydase, qui catalyse la réduction de l'oxygène en anion
15 superoxyde. Ce dernier produit dans le phagosome sera rapidement transformé en H_2O_2 et OH^\bullet .

Les oxydases contenues dans les peroxysomes sont à l'origine d'une production radicalaire par transformation de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde et en peroxyde d'hydrogène.

20 Des radicaux hydroxyles sont produits au cours de la synthèse des prostaglandines, au niveau de la transformation de l'acide arachidonique en endoperoxydes sous l'effet de la cyclooxygénase. Ces radicaux libres interviendraient secondairement sur la cascade de l'acide arachidonique en inhibant la voie de la cyclooxygénase et en privilégiant la voie pro-aggrégante du thromboxane A_2 .

25 L'organisme est doté de systèmes de protection contre les radicaux libres, de façon à assurer l'équilibre garantissant le maintien des RLO à un niveau tel qu'ils n'exercent que leur rôle positif.

Il existe en premier lieu des enzymes spécifiques qui contribuent à l'équilibre en RLO, à savoir : la SuperOxyde Dismutase (SOD), Glutathion
30 peroxydase (GSH-Px), la catalase.

La SOD est une enzyme cytoplasmique et mitochondriale dont le rôle est d'éliminer l'anion superoxyde en catalysant sa dismutation. Il s'agit d'une métalloprotéine. Chez l'homme, on distingue deux variétés de SOD selon la nature du métal : l'une est dans le cytoplasme, son site actif contient du cuivre et du zinc, l'autre est
35 mitochondriale et renferme du manganèse. L'action de la SOD doit obligatoirement

être couplée à celle des catalases / peroxydases pour éviter l'accumulation du peroxyde d'hydrogène.

La GSH-Px catalyse la décomposition des radicaux peroxydes, hydroperoxydes et de l'eau oxygénée. Son fonctionnement consomme du glutathion réduit. Localisée dans les mitochondries et le cytoplasme, il s'agit d'une sélén-
5 enzyme, une déficience en sélénium étant de ce fait à l'origine de la lipoperoxydation.

La catalase est une enzyme renfermant un atome de fer. Son rôle est de catalyser la dismutation du peroxyde d'hydrogène, en eau et en oxygène moléculaire.

La limitation de la quantité de RLO est également obtenue par
10 l'intermédiaire de piègeurs de radicaux libres. Ce système de protection, complémentaire du système de défense enzymatique, est à la fois cytosolique (glutathion, acide ascorbique) et membranaire (vitamine E, vitamine A). La caractéristique commune de ces composés est d'être facilement oxydable.

L'alpha-tocophérol (vitamine E), inclus à l'intérieur des membranes
15 cellulaires, s'oppose à la peroxydation des lipides membranaires.

Le glutathion, la cysteine et l'acide ascorbique, tous trois situés dans le compartiment hydrique de la cellule, doivent leur rôle éliminateur à une activité dismutatique.

Il existe enfin, à un degré moindre des systèmes de protection externes
20 dans les divers liquides extracellulaires, les mécanismes de défense sont bien moins importants, expliquant la vulnérabilité de la membrane plasmique à une agression radicalaire d'origine extracellulaire. Cependant, des métallo-protéines sériques, telles que la transferrine et la céruloplasmine exercent une faible activité dismutatique.

Les mécanismes défensifs précédemment décrits sont habituellement
25 suffisants pour contenir la production de RLO et permettre un fonctionnement cellulaire normal. Cet équilibre oxydants/anti-oxydants peut toutefois être rompu, soit du fait d'une surproduction radicalaire, soit d'un affaiblissement des moyens de défense. C'est alors que s'exprime la toxicité des radicaux libres, trois grandes cibles cellulaires sont visées, à savoir : les membranes, les protéines et les acides nucléiques.

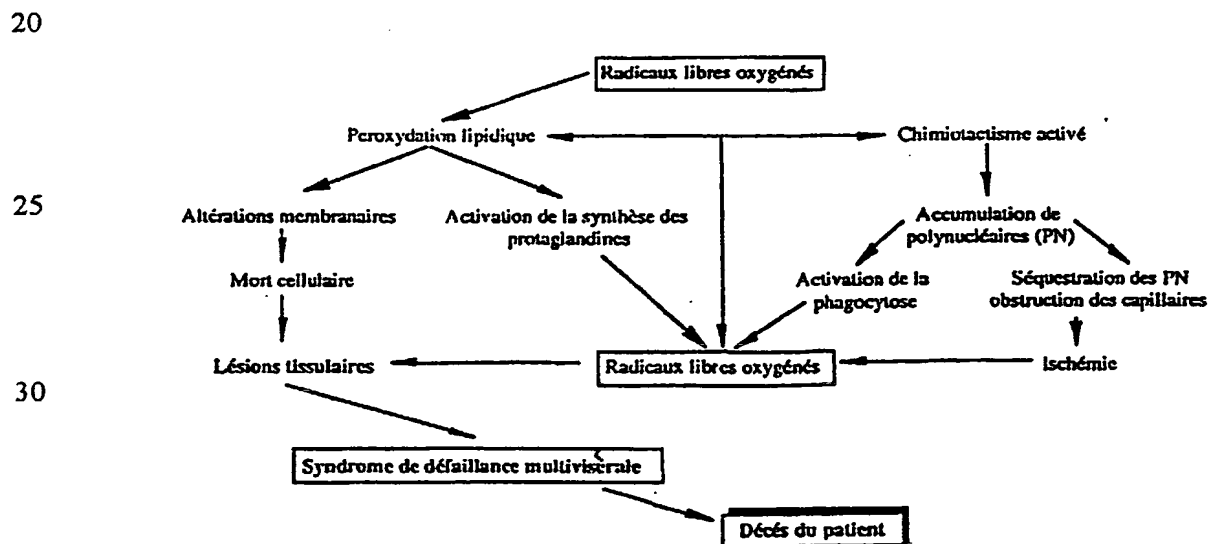
S'agissant des membranes, les radicaux libres initient la peroxidation
30 lipidique qui porte atteinte à la disposition architecturale de la membrane, pouvant aller jusqu'à la lyse complète de la cellule. Cette lipoperoxydation aboutit à la formation de produits de dégradation tels que malondialdéhyde (MDA), lipofuschine, éthane et pentane, composés dont le dosage permet d'évaluer l'importance de
35 l'atteinte.

S'agissant des protéines, ce sont essentiellement les protéines à groupement sulfhydryle (-SH) qui sont concernées. Parmi ces protéines soufrées, on compte de nombreuses enzymes cellulaires qui se trouvent de ce fait inactivées.

S'agissant des acides nucléiques, les principales atteintes des radicaux libres se portent au niveau des chromosomes. Les sites radicalaires créés au sein de la molécule d'ADN entraînent des ruptures de brins et des mutations ponctuelles. Ces dénaturations de l'ADN ont des conséquences sur la multiplication, la transmission ou la replication du message génétique, et donc sur la synthèse des protéines.

Lorsqu'il existe un état de choc secondaire à un acte chirurgical majeur, un polytraumatisme, un infarctus ou à une infection, l'activation des polynucléaires s'accompagne d'une augmentation de leur consommation d'oxygène avec production accrue de l'anion superoxyde, du radical hydroxyle et du peroxyde d'hydrogène. Il en résulte une peroxydation des membranes lipidiques.

Les principaux tissus lésés dans un tel processus sont les poumons, le foie, le coeur, les reins et le tractus digestif. Si les défenses anti-oxydantes sont dépassées, une véritable "cascade" de réactions s'installe, aboutissant à un auto-entretien du processus par les radicaux libres oxygénés, responsable du syndrome de défaillance multiviscérale et de la mort du patient. La Figure ci-dessous montre que le processus aboutissant au syndrome de défaillance multiviscérale et au décès.



Normalement, la production endogène de radicaux libres est contrebalancée par tous les systèmes de défense, et l'organisme ne souffre pas. Cette production de formes activées de l'oxygène peut même être bénéfique, pour lutter

contre les infections. Cependant, de nombreuses situations pathologiques peuvent entraîner l'apparition d'un excès de radicaux libres, donc un déséquilibre.

Ces situations sont les suivantes :

Pathologies chroniques	Pathologies aiguës
Athérosclérose	Ischémie-reperfusion
Cancer	Hyperoxygénation
Emphysème	Brûlures étendues
Cirrhose éthylique	Choc septique
Diabète	Inflammation
Cataracte	Allergie
Dystrophie musculaire	Arthrite
Trisomie 21	Irradiation
Maladie de Crohn	Intoxication
Arthrose	Pancréatite aiguë
Maladie d'Alzheimer	
Maladie de Parkinson	
Vieillessement cellulaire	
Polyarthrite rhumatoïde	

5

Dans bon nombre de ces pathologies, le stress oxydant issu de l'excès de radicaux libres, est intimement lié à une réaction inflammatoire. Cette dernière est classiquement une réponse que fournit l'organisme face à une infection. Il importe que la réaction inflammatoire soit qualitativement et quantitativement adaptée à l'infection.

10

Dans certains cas, l'inflammation et l'infection s'emballent parallèlement et on peut ainsi évoluer d'une simple réaction d'inflammation locale d'évolution rapidement favorable, pour aboutir parfois à la défaillance multi-viscérale en passant par la réponse systémique à l'infection. Le choc septique est un aspect particulier de l'infection grave où prédomine l'hypotension, qui persiste malgré le remplissage vasculaire adapté en d'autres termes le choc septique est une insuffisance circulatoire aiguë d'origine infectieuse, mettant en jeu le pronostic vital.

15

Avant d'en arriver à ce stade infectieux ultime on passe successivement par les stades infectieux suivants :

20

- 1- Syndrome d'inflammation systémique aiguë SIRS
- 2 - Infection systémique (sepsis ou septicémie).
- 3 - état infectieux grave (septicémie sévère).

Cette réaction inflammatoire est un réseau particulièrement complexe de phénomènes faisant intervenir de nombreux médiateurs tels que les cytokines ou les

prostaglandines ainsi que des cellules activées produisant lesdits médiateurs. Les interactions sont nombreuses et subtiles. Une même cellule et un même médiateur peuvent avoir à la fois des effets bénéfiques et des effets toxiques rendant toute intervention thérapeutique délicate.

5 La cascade d'événements qui conduit au choc septique et éventuellement au décès est déclenchée par des substances portées par les germes, peptidoglycanes pour les germes Gram positif, et lipides A (Lipopolysaccharides ou LPS), pour les Gram négatif. Ces substances provoquent chez l'hôte une réaction immunitaire qui met en jeu macrophages, leucocytes, cellules endothéliales, cytokines (TNF, IFN en
10 particulier), facteurs de coagulation, radicaux libres et un grand nombre de médiateurs de l'inflammation.

Ces dernières années, plusieurs travaux ont mis en évidence une augmentation des radicaux libres oxygénés chez des patients en sepsis sévère ou choc septique

15 L'interaction avec un micro-organisme déclenche l'activation métabolique oxydative des cellules phagocytaires, plus connue sous le nom "d'explosion respiratoire". Il est aujourd'hui bien établi que l'activation métabolique oxydative comprend une succession de réactions oxydatives en chaîne, prenant naissance dans la membrane plasmique. Elle s'accompagne d'une augmentation importante de la
20 consommation d'oxygène et d'un accroissement considérable du catabolisme du glucose. Au terme de la réaction, sont libérés des anions superoxydes dérivés de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire. La réaction est catalysée par un complexe enzymatique membranaire, la NADPH-oxydase.

25 De nombreuses molécules, dont les constituants membranaires des bactéries (en particulier les LPS) sont susceptibles d'activer la NADPH-oxydase des cellules phagocytaires. Outre une activité microbicide, les anions superoxydes libérés vont amplifier la réponse inflammatoire au site infectieux, en augmentant le chimiotactisme. Parallèlement au processus radicalaire, il se produit une activation de diverses cellules immunes à l'origine de l'élaboration d'un réseau de communication
30 inter-cellulaire par l'intermédiaire des cytokines. Ainsi, les cytokines pro-inflammatoires libérées, IFN, IL1 et TNF, vont exercer un effet de "priming" sur les polynucléaires et les macrophages qui seront par voie de conséquence plus réactifs aux stimuli, tels que le LPS et autres dérivés bactériens. Cette réactivité se traduit par une augmentation de leur capacité à produire des anions superoxydes. En fait, dans un
35 contexte inflammatoire majeur, la libération amplifiée de cytokines pro-inflammatoires va participer également à la synthèse de radicaux libres. Ces radicaux vont être à

l'origine de lésions tissulaires majeures et conduire à plus ou moins brève échéance à une baisse de l'immunité cellulaire.

En conclusion, la superposition de tous ces phénomènes qui viennent d'être décrits, peuvent mettre en péril la vie de l'individu.

5 Les études épidémiologiques récentes confirment la gravité clinique croissante de ces stades de la réaction inflammatoire en réponse à l'infection, avec une mortalité de 16 % pour le sepsis, 20 % pour le sepsis grave et de 46 % pour le choc septique. Il ressort d'une étude française que l'incidence du sepsis grave et du choc septique est d'environ 40000 cas par an en France avec une mortalité de 56 %. Cette
10 forte mortalité, persistante malgré les progrès des traitements symptomatiques et de l'antibiothérapie qui restent cependant essentiels, explique pourquoi, ces dernières années, de nombreuses thérapeutiques nouvelles visant à contrôler la réaction inflammatoire ont été tentées chez l'homme. A ce jour, les essais thérapeutiques ont tous été des échecs, d'où de grandes déceptions et de nombreuses interrogations.

15 S'agissant précisément des thérapeutiques, un article de H.J. SCHILLER et al dans *critical care medecine*, 1993 vol. 21, N°2 S92-S102, fait une revue des thérapies anti-oxydantes, plus particulièrement en regard des dommages causés par les excès de radicaux libres en cas de reperfusion.

Le premier axe thérapeutique proposé par l'art antérieur et repris dans cet
20 article, est le blocage de la synthèse des radicaux libres. Un tel blocage est exercé au travers de l'inhibition de la xanthine-oxydase active dans la synthèse de radicaux superoxydes $O_2^{\cdot-}$. Les inhibiteurs utilisés sont par exemple l'allopurinol, l'oxypurinol, l'acide folique, la ptérine-aldéhyde, ou le tungstène. Il est également proposer de bloquer la transformation de xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase à l'aide de
25 trypsine de soja.

La deuxième voie préconisée dans la thérapie antioxydante est celle des piègeurs de radicaux libres, le piégeage pouvant être du type enzymatique ou non enzymatique.

C'est ainsi que l'on peut administrer de la SuperOxyde Dismutase exogène par voie
30 parentérale ou par instillation locale. Cette administration de SOD peut se faire à l'aide de différents vecteurs tels que les PEG ou les liposomes.

De la même façon, il a été proposé d'avoir recours à des administrations de catalase exogène.

Il existe par ailleurs des produits mimétiques de la SOD tels que les
35 complexes de cuivre, le desferal-Mn et les nitroxydes cycliques, qui agissent en tant

que piègeurs non enzymatiques de radicaux libres. Ces produits et plus particulièrement les deux premiers ce sont avérés relativement inefficaces.

On citera également des piègeurs non enzymatiques tels que le manitol, l'albumine, le diméthylsulfoxyde toxique, la diméthylthiourée....

5 On relevera en outre dans cette voie thérapeutique la technique de complexation des métaux de transition qui catalysent la formation des radicaux hydroxyles, comme par exemple la déféroxamine qui est un agent complexant du Fe^{+3} . Mais ce produit doit être associé avec de l'amidon hydroxyléthylé pour tempérer autant que faire se peut sa toxicité.

10 On a également essayé d'amplifier les défenses anti-oxydantes endogènes à l'aide de produits tels que l'oltipraz ou l'ebseen. L'oltipraz est un dioltione qui promeut le stockage hépatique de glutathione et de glutathione réductase. L'ebseen est un composé organique comprenant du sélénium et qui agit de la même façon que la glutathione peroxydase. C'est-à-dire qu'il est capable de réduire le peroxyde
15 d'hydrogène et des hydroperoxydes lipidiques, en présence de glutathione ou de N-acétylcystéine administrée de manière exogène.

La troisième voie connue pour contrarier la surproduction de radicaux libres consiste à bloquer le mécanisme d'amplification secondaire de cette production de RL, dont sont à l'origine les neutrophiles. Cela revient à supprimer l'activité de
20 l'enzyme NADPH-oxydase ou à inhiber l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium, sachant que cette adhésion est le préalable indispensable à la catalyse de la synthèse d'anions superoxydes par la NADPH-oxydase membranaire.

Les caractéristiques communes à toutes ces propositions thérapeutiques sont qu'elles reposent toutes sur l'administration d'un seul agent pharmacologique et
25 qu'elles sont toutes relativement inefficaces.

Dans le cadre plus spécifique du choc septique, d'autres cibles thérapeutiques ont fait l'objet d'une exploration.

On a ainsi tout d'abord essayé de s'attaquer aux éléments déclencheurs de la cascade immunitaire qui fait intervenir des facteurs de réaction d'inflammation ainsi
30 que des radicaux libres entre autres. Comme indiqué ci-dessus, certains de ces éléments déclencheurs sont des lipopolysaccharides LPS que l'on tente de neutraliser à l'aide d'anticorps (anti-LPS, anticorps anti-CD 14, anticorps anti-LBP et facteurs CD14 solubles).

Une autre cible envisagée antérieurement en thérapeutique est formée par
35 les médiateurs de l'inflammation que sont les cytokines. Ces produits, qui stimulent indirectement la production de radicaux libres, sont bloqués à l'aide :

- d'anticorps anti-TNF α ,
- de récepteur solubles au TNF α ,
- d'anticorps anti-IL6,
- d'IFN γ ,
- 5 - d'IL10,
- d'anticorps anti-IL1.

Les autres cibles thérapeutiques visées furent, d'une part, le métabolisme inflammatoire que l'on tempère à l'aide de corticoïdes à dose élevée et, d'autre part, le radical libre monoxyde d'azote par inhibition de la NO-synthase.

- 10 Ces quatre exemples de stratégies thérapeutiques essayées dans le traitement du choc septique sont donnés dans l'article de FOSTER et al « *Clinical trials for the evaluation of sepsis therapies* ». Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine. Ed. by JL Vincent 1997, p 49-60.

- 15 Aucune de ces tentatives antérieures qui sont toutes elles-aussi des monothérapies, n'a donné de résultat satisfaisant en terme de diminution de la mortalité et/ou de réduction des lésions graves associées. De plus, les résultats obtenus, quel que soit le mécanisme considéré sont soumis à controverse. Il n'y aurait en effet pas de bonnes corrélations entre les résultats obtenus et les principes actifs administrés. Cette divergence résulte de la diversité des protocoles d'administration
- 20 des molécules (moment de l'administration), des critères de choix de la population admise dans l'étude, et, lorsqu'il s'agit de modèles animaux, du choix du modèle infectieux (LPS ou bactéries vivantes).

- De nombreuses autres voies d'action sont actuellement à l'étude y compris la voie antioxydante. Cependant, les données de la littérature sont
- 25 relativement pauvres en ce qui concerne les essais de produits anti-oxydants notamment pour des pathologies aussi aiguës que le choc septique.

En tout état de cause, les méthodes thérapeutiques testées jusqu'alors sont fidèles au principe pharmacologique de monothérapie c'est-à-dire d'administration d'un seul principe actif pharmacologique.

- 30 On examinera ci-après différents articles scientifiques étudiant les incidences des carences en zinc, sélénium, glutathion réduit (GSH) et N-acétylcystéine (NAC), vis-à-vis de l'équilibre anti-oxydant/oxydant.

- L'article de A. SINGH et al « *Biochemical indices of selected trace minerals in men : effect of stress* ». Am J Clin Nutr 1991 ; 53 : 126-131, rapporte le
- 35 résultat de travaux expérimentaux et cliniques qui ont mis en évidence, lors de traumatismes, de stress ou de choc septique, une diminution des taux sériques de zinc

et de sélénium. Cette diminution serait due à une utilisation accrue et/ou à une redistribution de ces oligoéléments vers les organes clés (foie, poumons) de la défense anti-radicalaire.

5 D'après l'article de BRAY TM & BETTGER WJ. « *The physiological role of zinc as an antioxydant. Free Rad Biol Med, 1990 ; 8 : 281-91* », le zinc joue un rôle d'antioxydant indirect en assurant la stabilisation de la Zn-SOD cellulaire, mais également au travers d'autres propriétés anti-oxydantes :

- inhibition, production RLO par compétition avec Fe et Cu,
- protecteur oxydation des thiols des protéines,
- 10 - inhibition, peroxydation lipidique de même que de l'enzyme NADPH-oxydase, des microsomes hépatiques et des macrophages.

La littérature scientifique relative au zinc dans le cadre de la lutte contre le stress oxydant, ne suggère nullement de recourir à l'administration de zinc pour pallier aux carences à des fins thérapeutiques, en particulier pour le traitement du choc septique.

15 S'agissant du sélénium, c'est un oligoélément connu pour ses propriétés de stimulation de la défense anti-oxydante. On sait en effet que le sélénium est impliqué sous forme de sélénocystéine dans le site actif de la glutathion peroxydase (GPx).

20 L'activité de la GPx est fortement influencé par la séléniémie et les autres réserves en sélénium. Il a notamment été montré par FORCEVILLE et al, « *Serum selenium decrease is correlated with the increase of the APACHE II index and the presence of a SIRS* ». Clin Int Care, 1995 ; 6 : 52, que la séléniémie est inversement corrélée à la gravité du syndrome de réponse systémique inflammatoire.

25 L'article de D. VITOUX et al « *low plasma selenium in patients admitted in a intensive care unit is related to systemic inflammatory response syndrom and sepsis* ». Therapeutic Uses of traces Elements, edited by NEVE et al - 1996 p 127-131, propose, tout en notant que la diminution de la séléniémie peut être bénéfique, d'administrer du sélénium aux patients victimes d'un stress ou d'un choc oxydant (choc septique). Cette proposition thérapeutique concerne le sélénium seul et reste
30 entièrement spéculative en ce qui concerne, l'aspect positif des résultats que l'on est susceptible d'obtenir.

Parmi les autres acteurs biochimiques de régulation de la production de radicaux libres, figurent les composés réducteurs, de préférence les thiols et plus
35 spécialement encore le glutathion réduit GSH. Il s'agit d'un tripeptide synthétisé à partir de la cystéine, de la glycine et de l'acide glutamique. En tant que substrat de la

GP, le glutathion réduit est un facteur anti-oxydant très important. La GPx transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et les hydroperoxydes lipidiques en alcool. Le taux plasmatique de GSH dépend de la synthèse hépatique. En cas de stress oxydant, cette synthèse peut s'avérer insuffisante. Il s'installe alors une dépression en GSH qui
5 aggrave la cytotoxicité des radicaux libres. Des études expérimentales et cliniques ont mis en évidence cette déplétion en GSH érythrocytaire et/ou hépatique dans les états de stress oxydant (CIRIOLO et al « *Loss of GSH, oxidative stress, and decrease of intracellular pH as sequential steps in viral infection* ». J Biol Chem, 1997 ; 31 2700-8).

10 De même, HAMMARQVIST et al (« *Skeletal muscle glutathione is depleted in critically ill patients* ». Crit Care Med, 1997 ; 25 : 78-84. »).

Le glutathion ne passe pratiquement pas la membrane cellulaire. Par conséquent, il ne pourrait être utilisé que comme agent anti-oxydant extra cellulaire mais pas en tant qu'agent protecteur intra-cellulaire. Mais de toute façon,
15 l'administration de glutathion n'est pas proposée comme méthode de traitement thérapeutique d'un déséquilibre production/élimination de radicaux libres. (choc septique).

L'article d'HENDERSON et HAYNES (« *Acetylcysteine as a cytoprotective antioxydant in patients with severe sepsis : potential new use for an old drug* ». Ann Pharmacother, 1994 ; 28 : 1086-8) suggère l'utilisation thérapeutique
20 d'un précurseur du glutathion, à savoir la N acétylcystéine (NAC). Ce précurseur du glutathion est apte à franchir la barrière membranaire cellulaire pour reconstituer le pool intracellulaire de GSH et fortifier par la même les défenses anti-oxydantes.

Cet article d'HENDERSON et HAYNES fait état de résultats parfois
25 contradictoires pour des études d'administration de NAC chez les patients souffrant de syndrome de détresse respiratoire (pas d'effet positif constaté) et pour des études avec des patients souffrant de syndrome de réponse inflammatoire systémique (sepsis sévère) qui ont donné quant à elles des résultats encourageants. Les auteurs en concluent que les études quant à cette thérapeutique d'administration d'un seul
30 principe actif (la NAC) pour traiter des chocs septiques, doivent être poursuivis et pourraient donner des résultats positifs, notamment si l'administration de la NAC se fait de manière relativement précoce dans l'évolution de la maladie.

Il ressort de cette revue de l'art antérieur que les tentatives de traitement thérapeutique des pathologies oxydatives liées notamment au dérèglement des
35 processus de production et d'élimination des radicaux libres, ne se sont avérés pour l'instant que partiellement fructueuses et non satisfaisantes.

La pathologie qui a concentré le plus d'efforts est le choc septique ou ces formes moins graves dont notamment le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS), n'ont donné lieu qu'à une stratégie thérapeutique de blocage du processus inflammatoire et/ou oxydatif de production de RL, en insistant sur certaines

5 cibles qui sont :

- les lipopolysaccharides LPS (LPS bactériens),
- les médiateurs de l'inflammation que sont les cytokines,
- le métabolisme inflammatoire en lui-même
- et la NO synthase.

10 Les résultats obtenus ne sont pas convaincants.

Une autre stratégie qui vise à combler les carences de certains éléments intervenant dans la régulation inverse du stress oxydatif, a toujours été basé pour l'instant sur la mise en oeuvre d'un seul principe actif ou agent pharmacologique et rien ne pouvait inciter l'homme de l'art à sortir de cette voie, eu égard à la complexité
15 des mécanismes en cause et à la méconnaissance de ceux-ci et des interactions qu'ils comprennent entre différents facteurs.

Dans ce contexte, l'un des objectifs essentiels de la présente invention est la mise au point d'un médicament utilisable notamment pour le traitement des pathologies oxydatives, tel qu'un syndrome ou choc septique, un syndrome de
20 réponse inflammatoire systémique...

Un autre objectif de la présente invention est de fournir un médicament qui soit apte à remédier au désordre des mécanismes oxydatifs de production/élimination de radicaux libres et qui soit simple à préparer et économique.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir un
25 médicament de traitement des stress oxydants, qui soit stable et qui permette de traiter un large éventail de pathologies, dans lesquelles intervient une surproduction délétère de radicaux libres.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir un produit anti-oxydant, qui puisse servir de base à la préparation de médicaments sus-
30 visés.

Un autre objectif de l'invention est de proposer l'utilisation d'un produit adapté pour la préparation d'un médicament applicable pour le traitement de pathologies oxydatives et, en particulier, des maladies suivantes : choc septique, syndrome de détresse respiratoire aigüe, syndrome de réponse inflammatoire
35 systémique, polytraumatismes, ischémie/reperfusion, maladie auto-immunes telle que

la polyarthrite chronique rhumatoïde, le cancer, le sida, la sclérose en plaque, la maladie de Parkinson.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir un produit cosmétique, utilisable notamment contre le vieillissement des cellules par exemple de la peau.

Ces objectifs, parmi d'autres, sont atteints par la présente invention qui concerne en premier lieu une composition antioxydante caractérisée en ce qu'elle comprend :

- Δ d'une part, au moins un composé réducteur - de préférence un thiol - et/ou au moins l'un de ses précurseurs,
- Δ d'autre part, un ou plusieurs oligoéléments, de préférence sélectionnés parmi ceux associés à des enzymes anti-oxydantes, ces dernières étant plus spécialement choisies parmi celles énoncées ci-après : catalase, glutathione-peroxydase et SuperOxydeDismutase (SOD).

Selon un premier mode de mise en oeuvre, cette composition est liquide et plus spécialement encore est une solution - avantageusement aqueuse - anti-oxydante comportant, à titre de solutés, les constituants de la composition ci-dessus définie.

Selon un second mode de mise en oeuvre, cette composition se présente sous forme solide, de préférence sous forme sèche ou sous forme de lyophilisat. En pratique, il pourra s'agir d'une poudre.

Sans que cela ne soit limitatif, l'une des vocations premières de la composition selon l'invention est de constituer un médicament lato sensu.

Ce médicament, qui constitue l'un des objets de la présente invention, peut être plus spécialement destiné au traitement de pathologies oxydatives, qui résultent de la présence d'un excès de radicaux libres dans l'organisme.

La Demanderesse est particulièrement méritante d'avoir mis au point une telle composition (solution) thérapeutique, qui s'affranchit totalement des préceptes en vigueur en matière de pharmacologie de lutte contre le stress oxydatif, s'insérant ou non dans un environnement inflammatoire.

En effet, il ne s'agit plus désormais de mettre en oeuvre un seul principe actif mais de prendre le pari d'une association d'au moins un réducteur (ou anti-oxydant) et d'au moins un oligoélément, qui ont notamment pour caractéristique commune d'être en déplétion chez les patients souffrant de ces pathologies oxydatives, où les RL en excès ont un effet deletère et multitraumatique.

De manière surprenante et inattendue, cette association en combinaison d'au moins deux composants, s'est révélée avoir un effet synergique quant au traitement de pathologies oxydatives, telles que celles faisant intervenir un stress oxydant comme par exemple le choc septique.

5 Cette synergie s'est exprimée en particulier au travers de la diminution de la létalité de cellules et d'animaux, affectés par un modèle standard et déterminé de stress oxydant.

La composition selon l'invention (de préférence la solution aqueuse), révèle une bonne efficacité quant à la limitation des phénomènes de peroxydation et
10 notamment de lipoperoxydation.

Les déficits en oligoéléments affectent généralement les systèmes cellulaires anti-oxydants. Cela tient au fait que ces oligoéléments font partie intégrante des enzymes intervenant dans lesdits systèmes.

En particulier, les sous-produits de la lipoperoxydation voient leur
15 concentration diminuer sous l'effet d'un traitement à l'aide de la composition selon l'invention. On observe en particulier une chute des malonatedialdéhydes (MDA) qui sont un exemple de tels sous-produits.

La composition plus spécialement thérapeutique selon l'invention contient, de préférence, à titre de composé réducteur ou anti-oxydant au moins un
20 thiol réducteur (de préférence un) et au moins l'un de ses précurseurs (de préférence un).

Dans la mesure où le parti pris par l'invention est l'obtention d'un effet thérapeutique par activation des voies enzymatiques antioxydantes, on privilégiera un thiol réducteur (antioxydant) constitué par du glutathion réduit (GSH) ainsi qu'un
25 précurseur de celui-ci, la N-acéthylcystéine (NAC) étant particulièrement préférée.

Le GSH est transformé dans sa forme glutathion oxydée GSSG, lors de la réaction enzymatique de peroxylyse, par exemple d' H_2O_2 ou d'autres hydroperoxydes, en produit stable (eau) non générateur de radicaux libres, à l'aide de la glutathion peroxydase. Cette enzyme est présente à l'intérieur et à l'extérieur des cellules.

30 Le fait de mettre en oeuvre de la NAC qui est seule capable de traverser les membranes, permet de maintenir une concentration intracellulaire en GSH suffisante pour parer aux sollicitations importantes des systèmes de défense anti-oxydants.

De cette façon, on maintient à un niveau suffisant les taux érythrocytaires
35 et ou hépatique et/ou musculaire de GSH chez les patients soumis à des stress oxydants.

En ce qui concerne les oligoéléments de la composition selon l'invention, il est préférable de les sélectionner parmi ceux associés à des enzymes anti-oxydantes comme par exemple la superoxyde dismutase SOD, la glutathion peroxydase GPx, voire la glutathion transférase, la glutathion synthase, la NO oxydase...

5 D'où il s'ensuit que ces oligoéléments sont avantageusement sélectionnés dans le groupe suivant :

Sélénium ; Zinc ; Cuivre ; Manganèse et leurs mélanges ;

le Sélénium et le Zinc, pris à eux seuls ou en mélange entre eux, étant particulièrement préférés.

10 Au niveau du système immunitaire, le GSH est important pour le fonctionnement des lymphocytes. En effet, les lymphocytes carencés en glutathion sont plus sensibles aux chocs oxydants et leur cytotoxicité cellulaire est abaissée.

Le glutathion est également un piègeur de radicaux libres extracellulaires.

15 La NAC est un précurseur du glutathion capable de reformer rapidement les réserves intracellulaires de GSH fortement diminuées lors d'une pathologie oxydative, et ainsi augmenter les défenses anti-oxydantes. La NAC est un agent antioxydant qui agit de deux façons : d'une part en tant que piègeur de radicaux libres intra et extra cellulaire et d'autre part en tant que précurseur de GSH.

20 Sans vouloir être lié par la théorie, il semble que la composition selon l'invention tire au moins une partie de son efficacité par le fait qu'elle comprend en même temps au moins un composé réducteur et au moins un oligoélément, et de préférence, du glutathion et la NAC, d'une part, et du sélénium et du zinc, d'autre part. Il semble important que tous les éléments de la composition soient en effet administrés simultanément au patient pour optimiser l'efficacité.

25 Jamais jusqu'alors on avait imaginé l'association de co-facteurs réducteurs et métalliques pour des enzymes anti-oxydantes.

Selon des variantes avantageuses de l'invention, la composition peut être additionnée d'autres produits anti-oxydants et plus particulièrement de vitamine C et/ou de vitamine E ou bien encore de dérivés ou analogues de ces produits, comme
30 par exemple : alpha-tocophérol, diméthylsulfoxyde, coenzyme Q10, allopurinol, céto-isocaproate, β -carotène, urate, cystéine, céruloplasmine, transferrine...

L'invention a pour objet tout médicament et notamment ceux utilisables pour le traitement de pathologies oxydatives, comprenant la composition définie supra.

35 Avantageusement, ce médicament se présente :

- sous forme de liquide injectable, de préférence par voie intraveineuse, parentérale, sous cutanée et plus préférentiellement encore par voie parentérale
 - sous forme de liquide administrable per os et/ou par voie entérale,
 - sous forme de lyophilisat utile comme base de préparation de liquide
- 5 (e.g. solution aqueuse) injectable, de préférence par voie parentérale.
- ou bien encore sous forme sèche (e.g. poudre comprimée ou non, obtenue par séchage ou lyophilisation) pour administration orale et/ou entérale.

La forme liquide injectable est la forme galénique idoine pour l'administration. Mais en ce qui concerne la stabilité au stockage, il est préférable de

10 réaliser la composition sous forme solide (sèche), de préférence sous forme de poudre formée par un mélange des différents constituants de la composition. Il peut s'agir par exemple d'un lyophilisat permettant la reconstitution de solutions injectables ou buvables.

Naturellement, il est recommandé de produire la composition

15 thérapeutique sous forme stérile et apyrogène, à tout le moins pour ce qui concerne les formes injectables.

La préparation des compositions liquides selon l'invention s'opère en pratique au moyen de solutions-mères, à des pH précis, offrant la meilleure solubilité pour les solutés donnés. Ces solutions-mères sont à température ambiante ou sont

20 éventuellement chauffées pour faciliter la solubilisation des solutés. L'ordre d'introduction des différentes solutions mères est important pour obtenir un mélange final homogène formé par une solution exempte de précipités.

Le mélange final liquide peut être ensuite soumis à une élimination du solvant, qui est en général l'eau, pour obtenir des formes sèches (poudres, lyophilisats).

25

Ces formes sèches sont :

- soit redissoutes dans l'eau pour l'administration par exemple par injection,
 - soit laissées sous forme de poudres enrobées ou non dans des
- 30 gelules en gélatine
- soit mises sous forme de comprimés.

Classiquement, on peut employer des excipients et/ou des produits d'isotonicité comme par exemple le NaCl, le glucose, l'eau PPI (eau pour préparation injectable).

35 Le médicament selon l'invention qui comporte la composition définie supra peut être utile dans le traitement des maladies suivantes :

- choc septique,
- syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA)
- polytraumatismes,
- ischémie/reperfusion,
- 5 - maladies inflammatoires digestives,
- pancréatite aigüe,
- brûlures étendues,
- maladies auto-immunes.

On détaille quelque peu ci-après la formulation du médicament selon

10 l'invention.

Dans le cas où la composition est sous forme liquide (e.g. solution aqueuse) administrable par voie parentérale ou entérale, la formulation de l'extrait sec est avantageusement la suivante :

- | | | |
|----|----------------------------------|---------------|
| | - GSH | 20 à 300 g/l |
| 15 | - NAC | 20 à 300 g/l |
| | - Se | 2 à 50 mg/l |
| | - Zn | 0,1 à 1,5 g/l |
| | - vitE | 0 à 10 g/l |
| | - vitC | 0 à 10 g/l |
| 20 | - conservateurs (e.g. bisulfite) | 0 à 10 g/l. |

Une telle solution peut être conservée telle quelle ou mise sous forme lyophilisée.

Dans le cadre du 2ème mode de mise en oeuvre de la composition selon l'invention, on a à faire à une forme sèche (obtenue e.g. par lyophilisation) administrable e.g. par voie orale et correspondant à la formulation suivante, exprimée en quantité journalière recommandée (selon les pathologies) :

- | | | |
|----|--------|-----------------|
| 25 | - GSH | 0,2 à 30 g |
| | - NAC | 0,2 à 30 g |
| | - Se | 0,02 à 0,5 mg |
| | - Zn | 0,001 à 0,015 g |
| 30 | - vitE | 0 à 0,1 g |
| | - vitC | 0 à 0,1 g |

En pratique, la forme galénique la plus courante est avantageusement la forme sèche lyophilisée, conditionnée en flacons prévus pour la reconstitution d'un volume donné d'une solution aqueuse injectable.

35 Ainsi, la présente invention couvre par exemple une forme lyophilisée, destinée plus spécifiquement au traitement par injection du choc septique. La

formulation de cette forme galénique est exprimée en quantités contenues dans un flacon prévu pour un volume de 10 ml de solution reconstituée à partir du lyophilisat. Cette formulation est la suivante :

	- GSH	1,2 g
5	- NAC	1,2 g
	- Se	0,1 mg
	- Zn	5 mg.

La concentration des solutés de la composition lorsque celle-ci est une solution est comprise entre 10 et 300 g/l, de préférence entre 200 et 300 g/l, par exemple de l'ordre de 240 g/l.

Avantageusement le médicament selon l'invention est caractérisé en ce qu'il est destiné au traitement d'un syndrome infectieux et en ce qu'il se présente sous forme solide ou sous forme d'une solution susceptible d'être administrée per os et/ou par injection lorsque l'état infectieux du patient est caractérisé comme grave (sepsis sévère).

En d'autres termes, l'administration du médicament selon l'invention peut se faire lorsque les mécanismes de défense contre l'infection sont dans un état d'activation tel que la concentration sérique en IL6, en protéine C réactive ou en procalcitonine est au dessus d'une valeur plancher, déterminable par l'homme du métier selon la nature et la gravité du syndrome infectieux considéré.

Ces dispositions posologiques ou galéniques particulières sont liées au cas où la pathologie à traiter est du type infectieux. Dans cette hypothèse, il a pu être remarqué que si l'on traite trop précocement à l'aide du médicament anti-oxydant selon l'invention, on obtient l'effet inverse à celui recherché, c'est-à-dire que la mortalité croît significativement. En effet, on sait que les radicaux libres doivent intervenir dans la défense anti-bactérienne. En conséquence, si on les annihile prématurément, il est clair que cela ne fera qu'aggraver la prolifération bactérienne.

Aussi, selon une caractéristique remarquable de l'invention, on utilise des marqueurs reflétant l'ampleur de l'infection, ce qui permet de déterminer à quel moment le traitement anti-oxydant doit commencer. Ces marqueurs peuvent être les concentrations plasmatiques en neuromédiateurs du système immunitaire ou de l'inflammation. A titre d'exemples de marqueurs, on peut rappeler ceux déjà cités supra : IL6, protéine C réactive, procalcitonine.

La présente invention vise également l'utilisation de la composition définie supra pour la préparation d'un médicament utilisable pour le traitement de pathologies oxydatives et en particulier des maladies suivantes :

- choc septique,
- syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA)
- polytraumatismes,
- ischémie/reperfusion,
- 5 - maladies inflammatoires digestives,
- pancréatite aigüe,
- brûlures étendues,
- maladies auto-immunes.

10 L'effet de synergie entre les différents constituants de la composition thérapeutique selon l'invention, permet d'obtenir des résultats surprenants en terme de régulation et de contrôle des phénomènes de production de radicaux libres. Les stress oxydants sont ainsi limités et on parvient ainsi à maîtriser des maladies qui sont caractérisées par ce type de troubles.

15 La présente invention sera mieux comprise à l'aide des exemples qui suivent et qui décrivent la préparation de la composition selon l'invention et son application à la maîtrise de stress oxydant sur des cellules et sur des animaux.

DESCRIPTION DES FIGURES :

20 La Figure 1 est un histogramme donnant le pourcentage de survie cellulaire d'un modèle cellulaire soumis à un stress oxydant, en présence de solution anti-oxydante selon l'invention, en présence d'autres solutions anti-oxydantes comparatives et sans solution anti-oxydante (témoin).

25 La Figure 2 est un histogramme donnant la concentration au niveau du foie et du microsome en un produit de dégradation de la liperpéroxydation, à savoir le malonate dialdéhyde (MDA), pour différents lots de souris intoxiquées au CCl_4 et pour certains traités à l'aide de la solution anti-oxydante selon l'exemple 1.

La Figure 3 est un histogramme donnant la concentration en transaminases ASAT et ALAT, dosées pour différents lots de souris intoxiquées au CCl_4 et pour certains traités à l'aide de la solution selon l'exemple 1.

30 La Figure 4 représente l'histogramme de la concentration en glutathion réduit au niveau du foie (GSHf) en μg mesurée pour des lots de souris soumis à un stress au CCl_4 et traités pour certains à l'aide de solutions anti-oxydantes selon l'invention et préparées selon la méthode donnée à l'exemple 1.

35 La Figure 5 représente un histogramme de la concentration en glutathion réduit érythrocytaire (GSHe) exprimée en μl , et mesurée pour des lots de souris soumis à un stress oxydant au CCl_4 et pour certains traités à l'aide de la solution anti-oxydante de l'invention préparée conformément à l'exemple 1.

La **Figure 6** montre trois courbes donnant le pourcentage de survie chez des souris soumises à un choc septique et traitées pour certains lots à l'aide de la solution anti-oxydante selon l'invention préparée conformément à l'exemple 1.

- 5 La **Figure 7** montre deux courbes donnant le pourcentage de survie chez des souris soumises à un choc septique et traitées pour certaines à l'aide de la solution anti-oxydante selon l'invention préparée conformément à l'exemple 1, selon une posologie autre que celle correspondant à celle appliquée aux essais illustrés par la **figure 6**.

10 EXEMPLES

EXEMPLE 1 : PREPARATION DE LA COMPOSITION

On prépare une solution d'un mélange de solutés : GSH + NAC + sélénium + zinc.

On réalise tout d'abord des solutions mères à partir de chacun de ces solutés. La méthodologie employée est la suivante :

15 Pour un litre de préparation :

- Dissoudre le glucanate de zinc dans environ 100 ml d'eau distillée chaude (70° C),
 - Dissoudre dans un bécher contenant 500 à 600 ml d'eau distillée à 40° C le glutathion et la NAC,
- Mélanger les 2 solutions et laisser refroidir.

- 20 - Ajouter le sélénite de sodium préalablement dissout dans l'eau distillée froide,
- Ajuster à 1 litre avec de l'eau froide.

Une fois que l'on a obtenu la solution finale, on la soumet à des traitements de stérilisation et d'élimination des toxines pyrogènes.

On lyophilise ensuite cette solution.

- 25 Dans un flacon de lyophilisat reconstitué avec 10 ml de solution aqueuse de NaCl 0,9 % et/ou de glucose 5% et/ou d'eau PPI, on trouve :

- | | |
|---------------------------------|---------|
| 30 - glutathion réduit GSH..... | 1200 mg |
| - N-acétylcystéine NAC..... | 1200 mg |
| - sélénium..... | 0,1 mg |
| - zinc..... | 5 mg. |

**EXEMPLE 2 : VERIFICATION DE L'EFFICACITE DE LA SOLUTION GSH/NAC/Se/Zn
SELON L'INVENTION PAR MODELE IN VITRO : CULTURE DE FIBROBLASTES**

2.1. Matériel et méthode :

Le modèle standard de stress oxydant utilisé est induit par addition d'eau oxygénée dans un milieu de culture de fibroblastes. Le pourcentage de cellules vivantes après stress est déterminé par marquage colorimétrique de ces cellules (incorporation de rouge neutre). Les différents constituants à tester sont incorporés dans le milieu de culture pendant et après le stress. La solution anti-oxydante dont celle selon l'exemple 1 est ajoutée au milieu (dilution 1/2000ème).

2.2. Résultats :

La Figure 1 montre l'effet de différentes associations de thiols, d'oligoéléments et d'agents antioxydants sur un modèle cellulaire de stress oxydant au peroxyde d'hydrogène, au travers d'un histogramme donnant le % de survie cellulaire dans chaque essai. (les quantités de GSH, NAC, Se, Zn sont celles de l'exemple 1).

Il ressort de la Figure 1 que plus la concentration en H_2O_2 est élevée, plus le pourcentage de cellules vivantes est faible.

Pour une concentration en H_2O_2 modérée (7,5 mM) : toutes les associations ou produits de référence testés augmentent de façon plus ou moins significative le pourcentage de survie cellulaire, le produit le plus efficace étant l'association NAC, glutathion, sélénium et zinc.

Pour une concentration en H_2O_2 élevée (15 mM) : le stress oxydant induit à cette concentration est très puissant et les différences observées entre les effets protecteurs de chacun des produits testés beaucoup plus marquées. En effet, à cette concentration presque 100% des cellules du lot témoin sont tuées, tandis qu'après traitement avec l'association la plus complète (GSH, NAC, Se et Zn) le pourcentage de survie dépasse 80%. Il existe une complémentarité d'action entre le glutathion réduit et la N-acétyl-cystéine, l'effet protecteur étant supérieur lorsque ces deux thiols sont administrés ensemble. Cet effet n'est pas un simple effet additif mais bien une potentialisation, car le fait d'augmenter les concentrations soit en glutathion, soit en N-acétyl-cystéine n'augmente pas pour autant l'effet protecteur de chacun d'eux. Il faut absolument que les deux composés soient ensemble pour avoir un effet protecteur maximal.

Enfin, dernière observation, contrairement aux antioxydants de références testés (catalase et DMSO), plus le stress oxydant est important, plus l'association thiols + oligo-éléments est efficace.

Conclusion : Les résultats de cette étude confirment l'efficacité des 4 éléments de la composition selon l'invention dans la lutte contre le stress oxydant.

EXEMPLE 3

1ER MODELE IN VIVO :

10 3.1. Modèle d'hépatotoxicité au CCl₄ chez la souris :

L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet anti-oxydant de la solution selon l'exemple 1 dans un modèle standard d'intoxication hépatique induite par le tétrachlorure de carbone chez la souris (Parola M, Leonarduzzi G, Biaisi F, Albano E, Biocca M, Poli G, Dianzani M. Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. Hepatology, 1992; 16 : 1014-21.). L'intoxication par le CCl₄ est un modèle couramment utilisé chez l'animal pour induire une fibrose et éventuellement une cirrhose hépatique.

Le mécanisme toxique du CCl₄ met en jeu l'activation des cytochromes p450 avec production du radical trichlorométhyl CCl₃[•]. Celui ci réagit avec l'oxygène moléculaire pour donner un autre radical libre : le trichlorométhylperoxy (CCl₃O₂[•]). Ces radicaux libres entraînent l'apparition de lésions cellulaires (principalement localisées au niveau hépatique) par deux types de mécanismes : la péroxydation lipidique (caractérisée par une augmentation de la concentration en MalonateDiAldéhyde (MDA) et la formation de liaisons covalentes. Ce modèle est donc un bon modèle pour déterminer l'éventuel effet hépatoprotecteur de produits antioxydants.

25 3.2. Méthodologie - Protocole :

Animaux :

souris suisse Albinos de 13 semaines (6 souris/lot)

régime alimentaire standard

30 **Intoxication :**

intoxication aigüe - Administration voie intraquilonéale

1 injection CCl₄ à To (0,5 ml/kg) dissout dans de l'huile de paraffine.

Volume d'injection : 0,05 ml/10 g de poids corporel.

Traitement :

3 injections intrapéritonéales sont réalisées aux temps T-2h, T+2h et T+ 10 h par rapport au temps To de l'intoxication par le CCL₄

- 5 A T + 24 h les souris sont décapitées. Le sang et le foie sont prélevés pour analyses.
la solution selon l'invention (exemple 1) et injectée à la concentration de
0,15 ml/kg (pour la dose D x 1)
0,45 ml/kg (pour la dose D x 3)
le volume injecté à la souris étant toujours de 100 µl.

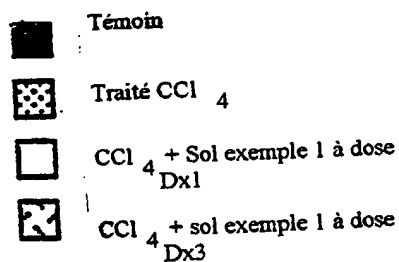
10 3.3. Résultats :

3.3.1. : malonate dialdéhyde (MDA) = produit de dégradation de la lipoperoxydation.

Au niveau hépatique, la dose de CCl₄ utilisée induit une augmentation des MDA (sur broyat de foie entier). Après injection de la solution selon l'invention (exemple 1), on observe une diminution de la concentration en MDA, par rapport au lot témoin CCl₄.

- 15 Au niveau du microsome, l'organe cellulaire impliqué dans la détoxification au niveau hépatique, le traitement avec la solution selon l'invention à la dose D x 3 = 0,45 ml/kg) diminue de 71 % l'augmentation des MDA induite par le stress oxydant. Cet effet "anti-CCl₄" de la solution selon l'invention est dépendant de la dose administrée.





- 20 La figure 2 montre les effets de la solution selon l'invention (exemple 1) sur les marqueurs de la peroxydation hépatique au travers d'un histogramme donnant la concentration en MDA en unité/g prot. pour les 4 essais suivants :



Les mesures de MDA sont effectuées par HPLc selon Richard MJ, J. Chrom 1992 ; 577 : 9-18.

3.3.2. : Transaminases

- 5 La concentration en transaminases dans la circulation sanguine est un marqueur sensible de la cytolysé hépatique. Après intoxication au CCl_4 , le taux de transaminase augmente très fortement, aussi bien au niveau des ASAT = Aspartate aminotransférase (marqueur plus spécifique d'une souffrance cardiaque) que des ALAT = Alamine aminotransférase (marqueur plus spécifique d'une souffrance hépatique).
- 10 La Figure 3 annexée montre les effets de la solution selon l'invention (exemple 1), sur les marqueurs de la cytolysé hépatique aux doses $D \times 1 = 0,15 \text{ ml/kg}$ et $D \times 3 = 0,45 \text{ ml/kg}$, pour chacun des essais suivants

- 15
- | | |
|---|--|
|  | Témoin |
|  | Traité CCl_4 |
|  | CCl_4 + Sol exemple 1 à dose $D \times 1$ |
|  | CCl_4 + sol exemple 1 à dose $D \times 3$ |
- 20

La solution selon l'invention diminue de 30 % l'augmentation des ASAT induite par le CCl_4 . Sur l'augmentation de la concentration en ALAT, on observe une diminution de 50 % après traitement avec la solution selon l'invention (ex1) à une dose $D = 0,15 \text{ ml/kg}$ (x1), et de 37 % avec la solution selon l'invention (ex1) à une dose $D = 0,45 \text{ ml/kg}$ (x3). L'effet observé sur la concentration en ALAT n'est pas dose-dépendant. Cependant, la différence entre ces deux valeurs n'est pas significative et demande à être confirmée sur un plus grand nombre d'animaux.





Les mesures d'ALAT et d'ASAT plasmatiques s'opèrent au moyen de la technique Kodak (Ektachem 700, Johnson and Johnson).

30

3.3.3. Glutathion





La défense de l'organisme face à un stress au CCl_4 est d'augmenter la concentration en glutathion réduit (piégeur de radicaux libres + substrat de la glutathione peroxydase) au niveau de l'organe agressé, ici le foie, comme le démontre la figure 4 annexée, qui

5 représente l'histogramme de la concentration en glutathion réduit au niveau du foie total GSHf (exprimé en $\mu\text{mol/g}$) pour chacun des essais suivants :

- 10
-  Témoin
 -  CCl_4
 -  Solution selon l'invention (exemple 1) à dose D x 1
 -  Solution selon l'invention (exemple 1) à dose D x 3

Cette mobilisation du glutathion réduit (GSH) s'effectue à partir des réserves érythrocytaires. Cela est montrée par la figure 5 annexée qui représente un histogramme de

15 la concentration en Glutathion réduit érythrocytaire GSHe (exprimé en $\mu\text{mol/l}$) pour chacun des essais suivants :

- 20
-  Témoin
 -  CCl_4
 -  Solution exemple 1 à dose D x 1
 -  Solution exemple 1 à dose D x 3

On observe après injection de CCl_4 une diminution significative de la concentration en glutathion réduit érythrocytaire. Après traitement avec la solution exemple 1 à dose D x 1 =

25 0,15 ml/kg, et à dose D x 3 = 0,45 ml/kg, cette mobilisation du GSH est réduite respectivement de 46% et 60%.

Une des conséquence directe de l'utilisation du glutathion lors du stress au CCl_4 en tant que piégeur, est la diminution de la concentration en glutathione peroxydase consécutive au manque de substrat. On observe une diminution de la concentration en glutathion

30 peroxydase hépatique après stress, qui est partiellement compensée (56%) par le traitement avec la solution selon l'invention (Dx3).

Conclusion : Les résultats démontrent au niveau hépatique, une action protectrice de la solution selon l'invention (exemple 1) sur une intoxication au CCl₄, mais surtout, ils confirment le bien fondé de la formulation. La solution selon l'invention (exemple 1) agit non seulement sur la peroxydation, en diminuant le taux de MDA, mais aussi au niveau des
5 défenses antioxydantes, en restaurant les stocks de glutathion réduit et d'enzymes antioxydantes. Le mécanisme d'action de la solution selon l'invention (exemple 1) est multidirectionnel. Elle agit comme antioxydant et stimulant des défenses antioxydantes physiologiques, et par conséquent augmente son activité anti-oxydante.

10 **EXEMPLE 4 :**

2EME MODELE IN VIVO

4.1. Modèle de choc septique chez la souris :

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet sur le taux de mortalité, de la solution selon l'invention sur un modèle de choc septique chez la souris.

- 15 Les points suivants ont motivé le choix de la bactérie *Salmonella typhimurium* dans ce modèle de septicémie expérimentale, en tant qu'agent inducteur :

- * le développement de l'infection à *S. typhimurium* évolue de façon progressive vers la septicémie. Par conséquent, l'ensemble des mécanismes immunitaires comprenant les cytokines et les espèces réactives de l'oxygène sont engagés dans la réponse de l'hôte. De ce
20 fait, les conditions physiopathologiques de ce modèle expérimental, à l'opposé des injections en bolus d'endotoxines, sont bien plus proches des événements associés, chez l'homme, à l'évolution d'une infection vers la septicémie, voir le choc septique.

- * les mécanismes non spécifiques (comprenant entre autre la production de radicaux libres) de la défense antibactérienne conditionnent l'évolution de l'infection vers la guérison ou la
25 mort, corollairement à l'intensité de la réaction inflammatoire. En outre, l'implication des radicaux libres dans les processus délétères survenant dans le contexte d'inflammation aiguë, est clairement établie.

- Ainsi, on peut supposer que l'apport exogène d'antioxydants au moment opportun au cours du développement de l'infection, peut contribuer à protéger l'animal des effets délétères
30 d'une surproduction de radicaux libres.

4.2. Mode opératoire : A To, infection par injection intrapéritonéale de la souche à tester à une concentration permettant d'avoir une DL50. Les solutions testées sont injectées par voie IP, selon deux protocoles : traitement précoce - traitement retardé.

L'évaluation de l'activité des solutions selon l'invention (exemple 1) est déterminée tout

5 simplement par dénombrement des souris restantes dans chaque groupe à la fin de l'étude.

La solution selon l'invention (exemple 1) est injectée à la concentration

de 0,15 ml/kg (pour la dose x 1)

de 0,45 ml/kg (pour la dose x 3),

le volume injecté à la souris étant toujours de 100 µl.

10

4.3. Résultats :

4.3.1. traitement précoce : L'infection expérimentale à *S. typhimurium* chez la souris, évolue de façon progressive vers une septicémie, lorsque la charge bactérienne de l'inoculum initial

15 est faible. La mort survient entre les 5ème et 7ème jours post infection. Dans un tel contexte infectieux, l'administration de la solution selon l'invention (exemple 1) à deux doses $D \times 1 = 0,15 \text{ ml/kg}$ et $D \times 3 = 0,45 \text{ ml/kg}$ dès la 6ème heure post infection et poursuivie quotidiennement pendant 5 jours à raison de 2 injections/jour, s'accompagne

d'une accélération et augmentation de la mortalité, par rapport au lot de souris infectées seules. On constate également un effet dose : la concentration la plus importante entraîne la

20 mortalité la plus forte. Néanmoins, en fin d'expérimentation, les taux de survie entre les animaux témoins et traités ne sont pas significativement différents. La solution possède un effet pharmacologique important, effet certainement anti-oxydant, avec une relation effet-

dose respectée. Ces résultats inattendus s'expliquent aisément. En effet, dans le contrôle de la défense à l'infection, les données de la littérature soulignent le rôle essentiel des

25 mécanismes non spécifiques radicalaires, qui se mettent en place rapidement. Ainsi, une neutralisation manifestement trop précoce de la production des espèces réactives de l'oxygène a diminué la défense antibactérienne, donc favorisé la prolifération bactérienne et par conséquent la mortalité.

La Figure 6 montre 3 courbes donnant le pourcentage de survie en fonction du nombre de

30 jours post-injection. Ces graphes correspondent aux cas suivants :

Les 2 flèches sur l'axe des abscisses marquent le début et la fin du traitement.

▲ Témoin

○ Solution exemple 1 à dose D x 1

□ Solution exemple 1 à dose D x 3

4.3.2. traitement retardé : A la suite des résultats précédents, on réalise une deuxième série d'expériences avec un inoculum bactérien équivalent. On choisi d'administrer la solution selon l'invention (exemple 1) à la plus forte dose D x 3, deux jours avant le début supposé de la mortalité. La solution a également été administrée sur une période plus longue, soit une première injection à J5 post infection suivi de 2 injections quotidiennes de J6 à J16. Dans ces conditions, la solution selon l'invention s'est révélée être efficace en terme de diminution de la mortalité.

En effet, comme le montre la figure 7, au 20ème jour post infection, le taux de survie dans le lot infecté témoin n'est que de 10%, tandis que dans le lot traité après infection avec la solution selon l'invention la survie est de 40%.

La figure 7 montre l'effet de la solution selon l'invention, en terme de survie, après infection à *S. typhimurium* (traitement tardif) au travers d'un histogramme donnant le pourcentage de survie en fonction des jours post infection pour les essais suivants :

▲ Témoin

□ Traité selon l'invention

Les deux flèches sur l'axe des abscisses marque le début et la fin du traitement.

.5. Conclusion : Plusieurs points importants se dégagent des résultats des exemples

- La solution selon l'invention a un effet pharmacologique important.
- Dans des pathologies oxydatives infectieuses la finalité de cet effet, bénéfique ou délétère, est conditionné par la posologie (début du traitement, durée et quantité à injecter).
- Pour de telles pathologies, il serait utile d'avoir un marqueur fiable permettant de commencer le traitement au bon moment. Il existe plusieurs "candidats" possibles : l'IL6, la protéine C-réactive et/ou la procalcitonine.
- La solution selon l'invention peut diminuer le taux de mortalité lors d'un choc septique.

REVENDICATIONS :

1 - Composition antioxydante caractérisée en ce qu'elle comprend :

Δ d'une part, au moins un composé réducteur - de préférence un thiol - et/ou au moins l'un de ses précurseurs,

5 Δ d'autre part, un ou plusieurs oligoéléments, de préférence sélectionnés parmi ceux associés à des enzymes anti-oxydantes, ces dernières étant plus spécialement choisies parmi celles énoncées ci-après : catalase, glutathione-peroxydase et SOD.

10 2 - Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme liquide, de préférence sous forme de solution aqueuse.

3 - Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme solide, de préférence sous forme sèche ou sous forme de lyophilisat.

15 4 - Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un thiol réducteur (de préférence un) et au moins l'un de ses précurseurs (de préférence un).

5 - Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le thiol est le glutathion réduit (GSH) et le précurseur est la N-acétyl-cystéine (NAC).

20 6 - Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les oligoéléments sont sélectionnés dans le groupe suivant : Sélénium ; Zinc ; Cuivre ; Manganèse et leurs mélanges ; le Sélénium et le Zinc, pris à eux seuls ou en mélange entre eux, étant particulièrement préférés.

25 7 - Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle contient de la vitamine E et/ou de la vitamine C.

8 - Médicament utilisable notamment pour le traitement de pathologies oxydatives, caractérisé en ce qu'il comprend la composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

30 9 - Médicament, notamment pour le traitement de pathologies oxydatives, caractérisé en ce qu'il comprend la composition selon l'une quelconque des revendications 1, 4 à 7 et en ce qu'il se présente :

• sous forme de liquide selon la revendication 2 injectable de préférence par voie parentérale ;

35 • sous forme liquide selon la revendication 2 pour administration orale et/ou entérale,

- sous forme de lyophilisat selon la revendication 3, utile comme base de préparation d'un liquide injectable, de préférence par voie parentérale,

- ou bien encore sous forme sèche selon la revendication 3 pour administration orale et/ou entérale.

5 10 - Médicament selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend de la composition sous forme liquide, et en ce que l'extrait sec de cette composition répond à la formulation suivante :

	- GSH	20 à 300 g/l
	- NAC	20 à 300 g/l
10	- Se	2 à 50 mg/l
	- Zn	0,1 à 1,5 g/l
	- vitE	0 à 10 g/l
	- vitC	0 à 10 g/l
	- conservateurs (e.g. bisulfite)	0 à 10 g/l.

15 11 - Médicament selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, pour le traitement des maladies suivantes :

- choc septique,
- syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA)
- polytraumatisme,
- 20 - ischémie/reperfusion,
- pancréatite aigüe,
- brûlures étendues,
- maladies inflammatoires digestives
- maladies auto-immunes

25 12 - Médicament selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisé en ce qu'il est destiné au traitement d'un syndrome infectieux et en ce qu'il se présente sous forme solide ou sous forme d'un liquide (de préférence solution) susceptible d'être administrée per os et/ou par injection lorsque l'état infectieux du patient est caractérisé comme grave (sepsis sévère).

30 13 - Utilisation de la composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour la préparation d'un médicament utilisable pour le traitement de pathologies oxydatives et en particulier des maladies suivantes :

- choc septique,
- syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA)
- 35 - polytraumatisme,
- ischémie/reperfusion,

- maladies auto-immunes,
- brûlures étendues
- maladies inflammatoires digestives,
- pancréatite aigüe.

**INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE**

RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 547733
FR 9710108

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO 93 10777 A (ALBION INT) * abrégé *	1-13

A	WO 92 21368 A (LIFE SCIENCES TECH INC) * page 1, ligne 29 - page 2, ligne 10 *	1-13

A	EP 0 665 245 A (ROHM & HAAS) * page 5, ligne 16-27 *	1-13

A	WO 94 13265 A (SMITH MILTON G) * abrégé; revendications 1-3 *	1-13

A	WO 96 10402 A (DYKE KNOX VAN) * page 6, ligne 20 - page 9, ligne 16 *	1-13

		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
		A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
24 avril 1998		Leherte, C

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général	D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite	L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire	& : membre de la même famille, document correspondant	

THIS PAGE LEFT BLANK